

Coleta e cultura de células-tronco obtidas da polpa de dentes decíduos: técnica e relato de caso clínico

Alan Araujo de Jesus*, Milena Botelho Pereira Soares**, Ana Prates Soares***, Renata Campos Nogueira****, Elisalva Teixeira Guimarães*****, Telma Martins de Araújo*****, Ricardo Ribeiro dos Santos*****

Resumo

Introdução: as células-tronco (CT) possuem capacidade de induzir a regeneração tecidual e, portanto, apresentam um potencial terapêutico. Assim como a medula óssea e o cordão umbilical, a polpa dentária é uma das fontes disponíveis de CT. O seu fácil acesso e o fato de os dentes decíduos não serem órgãos vitais, que normalmente são descartados após a esfoliação, provêm um atrativo para testes de segurança e viabilidade terapêutica dessas células. **Objetivos:** descrever a coleta, o isolamento e o cultivo de CT obtidas da polpa de dentes decíduos, assim como a sua caracterização por meio de citometria de fluxo e da indução da diferenciação em linhagens osteogênica e adipogênica. **Métodos:** as CT foram obtidas de forma relativamente simples e apresentaram boa capacidade proliferativa, mesmo a partir de pouca quantidade de tecido pulpar. **Resultados:** a análise por citometria de fluxo confirmou as características de CT mesenquimais, com baixos níveis de expressão dos antígenos CD34 e CD45, que são marcadores de células hematopoiéticas, e altos níveis de expressão dos antígenos CD105, CD166, CD90 e CD73, que são marcadores de CT mesenquimais. A plasticidade das células foi confirmada pela identificação de depósitos de cálcio nas culturas que receberam meio osteogênico, e de acúmulo lipídico intracelular nas culturas que receberam meio adipogênico. **Conclusões:** as CT de dentes decíduos têm um potencial promissor de aplicação em regeneração tecidual. Sendo assim, é importante difundir entre os cirurgiões-dentistas o conhecimento sobre a existência e as características dessa fonte de CT, discutindo a técnica utilizada, suas limitações e possíveis indicações.

Palavras-chave: Células-tronco. Terapia tecidual. Técnicas de cultura de células. Dentes natais.

Como citar este artigo: Jesus AA, Soares MBP, Soares AP, Nogueira RC, Guimarães ET, Araujo TM, Santos RR. Coleta e cultura de células-tronco obtidas da polpa de dentes decíduos: técnica e relato de caso clínico. *Dental Press J Orthod.* 2011 Nov-Dec;16(6):111-8.

» Os autores declaram não ter interesses associativos, comerciais, de propriedade ou financeiros que representem conflito de interesse, nos produtos e companhias descritos nesse artigo.

- * Doutor em Biotecnologia pela UEFS/Fiocruz.
- ** Pesquisadora Titular da Fundação Oswaldo Cruz/BA. Coordenadora do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI).
- *** Graduada em Odontologia pela UFB.
- **** Mestre em Biotecnologia pela UEFS/Fiocruz.
- ***** Doutora em Patologia pela Fiocruz/BA.
- ***** Professora Titular de Ortodontia na UFBA. Presidente do Board Brasileiro de Ortodontia e Ortopedia Facial.
- ***** Pesquisador Titular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz Fiocruz/BA. Coordenador de pesquisas básicas do Hospital São Rafael (HSR) – Monte Tabor, Centro Italo Brasileiro de Promoção Sanitária.

INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) são de grande interesse para a ciência, pois possuem a capacidade de estimular a regeneração tecidual e, conseqüentemente, apresentam diversas perspectivas terapêuticas¹⁻¹³, fato que torna possível sua utilização na Odontologia¹⁴. Contudo, ainda existem limitações na sua obtenção, cultivo e controle da proliferação e diferenciação, o que suscita a busca de novas fontes, técnicas e aplicações.

As CT podem ser de origem embrionária ou adultas^{2,6,15}. As CT adultas estão presentes em diversos tecidos, como pâncreas, medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical. Por serem obtidas do próprio paciente, essas células apresentam as vantagens de não desencadear rejeição imunológica, responderem aos fatores de crescimento inerentes ao hospedeiro, além de não incorrerem em limitações éticas e morais⁶. Isolar CT humanas adultas com alta qualidade, a partir de diferentes fontes acessíveis, é um dos pilares da terapia celular, pois elas apresentam características particulares e é possível que existam fontes preferenciais para cada necessidade específica^{12,16,17}.

Recentemente foi descoberta uma nova fonte de CT proveniente da polpa de dentes decíduos¹⁶. O seu fácil acesso e o fato de não serem órgãos vitais, que normalmente são descartados após a esfoliação, provêm um atrativo para testes de segurança e viabilidade terapêutica. Estudos realizados com essas células ressaltam uma grande capacidade de proliferação e de indução da regeneração tecidual^{12,17,18,19}, mas ainda existem limitações em relação à quantidade de células disponíveis e também quanto à técnica de coleta e cultura celular^{19,20}.

Embora ainda sejam necessárias uma padronização das técnicas e a realização de estudos clínicos que determinem o seu potencial de aplicação, o presente estudo visa, por meio de uma descrição de técnica e relato de caso, difundir entre os cirurgiões-dentistas o conhecimento sobre as CT obtidas a partir da polpa de dentes decíduos, discutindo a técnica utilizada, suas limitações e seu

possível potencial terapêutico. Isso permitirá que esses profissionais informem aos seus pacientes e responsáveis que, mesmo sendo uma técnica experimental, existe uma perspectiva promissora; e que esse tecido, usualmente descartado, pode ser coletado e criopreservado para um possível uso futuro.

TÉCNICA E RELATO DE CASO CLÍNICO

Obtenção do tecido

Paciente do sexo feminino, com 8 anos de idade, portadora de dentição mista, acompanhada desde os 5 anos por uma ortodontista, foi selecionada como doadora para coleta do tecido pulpar, após autorização dos seus responsáveis. Foram solicitados exames radiográficos e fotográficos e, em conjunto com a ortodontista, as unidades 6.3, 7.3, 7.5 e 8.3 foram definidas como alvo, por estarem na fase de esfoliação e não apresentarem lesões cariosas.

A cirurgia foi realizada em duas etapas, com um intervalo de 15 dias. Para a realização do procedimento é necessário um controle rigoroso da cadeia asséptica, devido à grande presença de microrganismos no meio bucal. Foi realizada a assepsia extra-bucal, profilaxia intrabucal, bochecho com clorexidina 2% e, em seguida, foi feita anestesia infiltrativa e gengival, sindesmotomia e retirada das unidades com um fórceps infantil, com um mínimo de tempo e contato com a saliva. Quaisquer resíduos de tecido mole foram retirados e as unidades foram imediatamente colocadas em recipientes individuais contendo meio de cultura DMEM (Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA) com 50mg/ml de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil), acondicionadas entre 4 e 8°C e encaminhadas para o laboratório para o isolamento das células.

Isolamento, seleção e expansão das CT mesenquimais

Todo o procedimento de retirada da polpa e cultura celular foi realizado em fluxos laminares verticais. O acesso à câmara pulpar foi feito, quando necessário, com discos diamantados (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) em baixa rotação, sob irrigação

constante, sendo o tecido pulpar retirado com o auxílio de curetas e limas endodônticas. Uma limitação encontrada foi a pequena quantidade de tecido pulpar obtido. Das quatro unidades dentárias extraídas, uma já não tinha tecido pulpar e as demais apresentaram pequena quantidade de polpa e, conseqüentemente, disponibilizaram poucas células para o início do cultivo. O tecido obtido foi imediatamente acondicionado em garrafas de cultura, com meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e armazenadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para proliferação celular e aderência à garrafa. A troca do meio completo foi feita a cada três dias, durante um período aproximado de 10 dias, quando a cultura obteve cerca de 80-90% de confluência, sendo acompanhada por meio de microscópio óptico invertido. As CT, após adesão à superfície plástica, apresentaram uma forma inicial ovoide, que evoluiu durante as primeiras 24 horas para uma forma fibroblastoide, que se manteve até a confluência (Fig. 1). Ao longo das trocas, as CT mesenquimais aderentes foram selecionadas, enquanto as células suspensas no meio de cultura foram sendo descartadas.

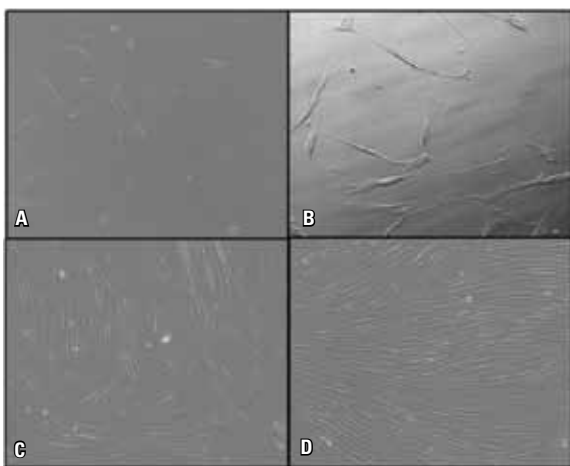


FIGURA 1 - Acompanhamento por microscopia óptica da cultura primária de CT provenientes de dentes decíduos. **A)** Células esparsas, ainda com forma arredondada. **B)** Células com característica fibroblastoide, após 72h de cultivo. **C)** Estabilização da morfologia celular e aumento da proliferação. **D)** Cultura com confluência total.

Após confluência da cultura, foi realizada a liberação das células da superfície plástica, para permitir a continuidade da proliferação e a criopreservação de parte das células. Para liberar as células, foi feita a troca do meio, por duas vezes, com solução salina estéril e, após a remoção da solução salina, foi adicionada solução de tripsina a 0,25% (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), durante 2-5 minutos, para que as ligações das células à matriz extracelular fossem desfeitas, permitindo o desprendimento das células da superfície plástica da garrafa de cultura.

Após confirmação do desprendimento das células, por observação em microscópio óptico invertido, a enzima foi inativada pela adição de meio completo. O meio da garrafa, contendo as células, foi então coletado utilizando-se uma pipeta e centrifugado a 1.500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células ressuspenso em 1ml de meio DMEM suplementado com 10% de SBF. Nesse momento, uma parte das células foi separada para criopreservação em nitrogênio líquido, para estudos posteriores e possíveis utilizações terapêuticas, enquanto o restante foi utilizado para continuidade da cultura, permitindo a caracterização *in vitro*.

Para a criopreservação, foi respeitada a concentração máxima de 10⁶-10⁷ células por tubo, sendo adicionado um volume final de 1ml, sendo 900µl de meio completo contendo as células e 100µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Os tubos de criopreservação foram submetidos a abaixamento criostático, variando a temperatura de 4°C a -80°C por 24 horas e, posteriormente, foram estocados em nitrogênio líquido.

Caracterização das CT mesenquimais

A caracterização das células foi realizada por meio da análise por citometria de fluxo e da confirmação da plasticidade celular por meio da indução da diferenciação em linhagens osteogênica e adipogênica.

Citometria de fluxo

As células da amostra foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos, e submetidas à leitura em citômetro de fluxo. Os anticorpos utilizados foram o anti-CD90 humano FITC, o anti-CD45 humano APC, o anti-CD166 humano PE, o anti-CD73 humano PE (BD Pharmingen), o anti-CD34 humano PE (Becton Dickinson) e o anti-CD105 humano FITC (R&D Systems).

As células com confluência abaixo de 100% foram tripsinizadas, conforme descrito anteriormente. Imediatamente após o desprendimento, as células foram ressuspensas em meio DMEM suplementado com 10% de SBF, e permaneceram em repouso na estufa por 2 horas. Após o período de repouso, as células foram lavadas com solução salina a 4°C por duas vezes, a 3.000rpm por 2 minutos a 10°C, e ressuspensas em 1ml de solução salina. Foram adicionados 200µl da solução em tubos, que receberam 2µl dos anticorpos. Os tubos foram incubados a 4°C ao abrigo da luz por 30 minutos e foram lavados por duas vezes com solução salina a 4°C (1ml) por centrifugação a 2.000rpm, a 1°C, durante 2 minutos. Após esse procedimento, foi realizada a aquisição dos dados e as análises no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA) utilizando o programa CellQuest. Pelo menos 50.000 eventos foram coletados e analisados.

Os resultados confirmaram as características de CT mesenquimais (Tab. 1) com baixos níveis de expressão dos antígenos CD34 e CD45, que

são marcadores de células hematopoiéticas, e altos níveis de expressão dos antígenos CD105, CD166, CD90 e CD73, que são marcadores de CT mesenquimais²⁰.

Diferenciação osteogênica

As células foram cultivadas em placa de 24 poços, em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, durante dois dias, até atingirem 50% de confluência. A partir desse momento, utilizou-se o meio indutor de osteogênese, que é composto por: meio DMEM contendo 10% de soro bovino fetal, 100nM de dexametasona, 0,05 de mM L-ácido ascórbico 2-fosfato e 10mM de b-glicerofosfato (Sigma-Aldrich, EUA). O tempo de cultura foi de 21 dias. Como grupo controle, as células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os experimentos foram feitos em triplicata, o meio das culturas foi trocado a cada três dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada diariamente através de microscópio óptico.

Para a confirmação da capacidade de diferenciação osteogênica, utilizou-se a marcação por alizarina vermelha, que identifica a deposição de cálcio na cultura. Após 21 dias de cultivo, as culturas foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% (Electron Microscopy Sciences, EUA) durante 30 minutos, lavadas duas vezes com água destilada, quando foi aplicada a alizarina vermelha 2% (Sigma-Aldrich, EUA) por três minutos. Após a remoção da alizarina, as culturas foram lavadas três vezes com água destilada, para remoção de resíduos, e as áreas coradas foram analisadas com microscópio óptico para confirmação da coloração e avaliação qualitativa.

Em todas as culturas que receberam meio osteogênico, foram encontradas deposições de cálcio em tonalidade vermelha, decorrente da coloração por alizarina, enquanto no grupo controle negativo não foram encontrados depósitos de cálcio em nenhum dos poços, confirmando a plasticidade das células cultivadas (Fig. 2).

TABELA 1 - Análise por citometria de fluxo de CT obtida de dente decíduo. Porcentagem de células positivas para CD90, CD73, CD34, CD45, CD166 e CD105 na população total.

MARCADORES	CITOMETRIA
CD90	99,92%
CD73	99,95%
CD34	0,08%
CD45	2,40%
CD166	96,80%
CD105	97,00%

Diferenciação adipogênica

As células foram cultivadas em placa de seis poços, em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, até atingirem 100% de confluência. Em seguida foram estimuladas, por até três semanas, com meio DMEM modificado contendo: 10% de soro bovino fetal, 60 μ M de indometacina (Sigma–Aldrich), 0,5 μ M de isobutilmetilxantina (Sigma–Aldrich) e 0,5 μ M de hidrocortisona (Sigma–Aldrich). Em todos os experimentos foi mantido um grupo controle cultivado em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os meios de cultura foram trocados a cada três dias.

A evolução da diferenciação foi acompanhada diariamente em microscópio invertido. Para observar a deposição de gordura, os poços foram lavados com PBS, as células foram fixadas com PFA 4%, durante 1 hora, à temperatura ambiente, e coradas com solução de Oil Red (Sigma - Aldrich) (3 volumes de 3,75% Oil Red O em isopropanol e 3 volumes de água destilada) por 5 minutos, seguido de lavagem com água destilada para remoção de resíduos.

Após 14 dias já foram identificados nas culturas acúmulos lipídicos intracelulares, confirmando a plasticidade das células cultivadas (Fig. 3), enquanto no grupo controle negativo não foram encontradas gotículas em nenhum dos poços.

DISCUSSÃO

A comunidade científica tem produzido trabalhos que demonstram a importância e as perspectivas da terapia com CT em áreas diversas como em lesões medulares^{2,3}, alterações neurológicas como Parkinson⁸ e mal de Alzheimer²¹, doenças autoimunes como diabetes tipo 1^{5,15}, doenças hepáticas¹³, lesões renais⁷ e degenerações da retina²². Em alguns casos, como nas doenças coronarianas, já existem resultados clínicos consistentes^{9,10} que indicam a sua segurança e viabilidade.

Na Odontologia, os experimentos têm sido voltados para o uso da terapia celular na regeneração de tecidos bucais^{12,14,23} e para a coleta, isolamento, cultivo e caracterização de CT a partir da polpa de dentes^{16-19,24}. Alguns estudos indicam que as CT obtidas dos dentes decíduos apresentam um maior potencial regenerativo e

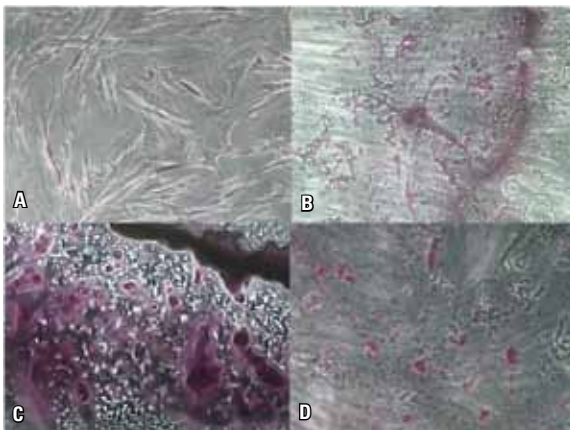


FIGURA 2 - Indução da diferenciação das CT de dentes decíduos cultivadas com meio osteogênico. Análise por microscopia óptica dos depósitos de cálcio corados pela alizarina vermelha após 21 dias de cultura. **A)** Controle negativo com meio DMEM, sem depósitos de cálcio. **B-D)** Diferenciação celular em meio de indução osteogênica, confirmada pela presença dos depósitos de cálcio corados pela alizarina vermelha.

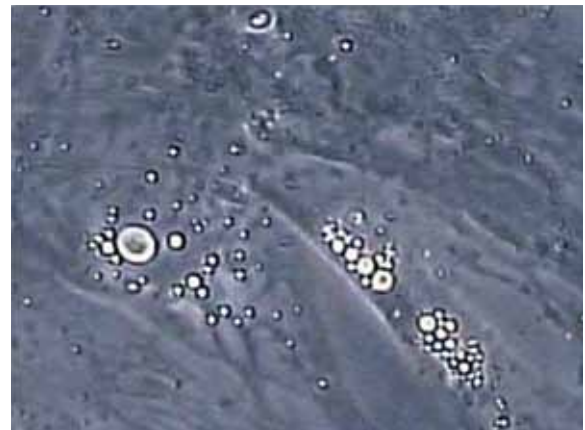


FIGURA 3 - Indução da diferenciação das CT de dentes decíduos cultivadas com meio adipogênico. Análise por microscopia óptica dos acúmulos lipídicos intracelulares após 14 dias de cultura, confirmando a diferenciação.

de proliferação do que as dos dentes permanentes^{16,17,19}, além de terem fácil acesso, não serem órgãos vitais e que, após a esfoliação, normalmente são descartados. Conjectura-se que CT de diferentes origens podem ter diferentes características e, conseqüentemente, indicações específicas para aplicação terapêutica.

A esfoliação dos dentes decíduos, entretanto, é um dos fatores limitantes do seu uso, pois acarreta em um tempo limitado de disponibilidade desse tipo de dente (a partir dos seis, até por volta dos 12 anos de idade da criança)²⁵. A maneira de se contornar essa limitação é indicar, aos responsáveis pelo paciente, a coleta do tecido no período da esfoliação e o cultivo e criopreservação das células em nitrogênio líquido. Essa técnica é bem estabelecida e descrita na literatura, o que permite a manutenção das suas características^{26,27}.

Recentemente, tem sido testada a possibilidade de criopreservação do tecido pulpar, ou até mesmo de todo o dente, ao invés das CT, para descongelá-lo quando necessário e realizar a coleta e cultura dessas^{28,29}. Sendo comprovado que essas células não sofrem alterações em qualidade e quantidade com o decorrer do tempo, esse processo de criopreservação do tecido, ao invés das CT, torna o armazenamento mais simples e com menor custo, pois o procedimento laboratorial de cultura só seria feito quando indicada a utilização das células, o que economizaria tempo, reagentes e pessoal, além de requerer uma estrutura laboratorial mais simples.

No presente trabalho, a técnica de obtenção e cultura das CT de dentes decíduos mostrou-se rápida e relativamente simples. No entanto, conseguiu-se pequena quantidade de tecido pulpar e, conseqüentemente, de células para iniciar a cultura. Essa condição pode se constituir em um obstáculo para sua utilização efetiva como terapia, pois pode ser necessário um maior tempo de cultura e de divisões celulares, o que pode levar a mudanças nas características dessas células²⁰. Dessa forma, uma alternativa a essa limitação é

solicitar a avaliação e o acompanhamento do paciente com dentição mista por um ortodontista, para indicar a realização de exodontias de um número maior de unidades, mas que não alterem o desenvolvimento normal da dentição.

Outro problema a ser evitado, por características próprias do meio bucal, é o risco de contaminação das culturas por microrganismos^{28,29}. Além dos cuidados de manipulação inerentes à técnica de cultivo de células, faz-se necessária a observação de critérios tais como a ausência de lesões cáries extensas nas unidades dentárias selecionadas, controle da cadeia asséptica durante o procedimento cirúrgico, além de evitar que a polpa da unidade retirada entre em contato com os fluidos bucais. Devem ser selecionadas unidades dentárias em estado avançado de rizólise, mas com epitélio juncional íntegro, para não ocorrer uma contaminação prévia do tecido pulpar.

Recentemente, a American Academy of Pediatric Dentistry publicou um texto³⁰ que aconselha os dentistas a acompanharem os avanços dos trabalhos publicados sobre as CT originárias de dentes decíduos, para que eles possam orientar os pais sobre a coleta, cultura, preservação e possíveis usos dessas células.

CONCLUSÃO

A técnica de coleta e cultura de CT obtidas de dentes decíduos mostrou-se relativamente simples e rápida. A utilização dessas células ainda não está indicada para o uso clínico corriqueiro, mas apresenta perspectivas promissoras. Sabe-se, portanto, que são necessários novos experimentos, *in vitro* e *in vivo*, e estudos clínicos para confirmar a sua segurança e viabilidade. Entretanto, essa possibilidade deve ser divulgada entre cirurgiões-dentistas, para inseri-los no contexto da terapia celular e, dessa forma, permitir que informem seus pacientes e responsáveis a respeito dessa fonte de CT, uma vez que existe um período restrito de acesso aos dentes decíduos.

Collection and culture of stem cells derived from dental pulp of deciduous teeth: Technique and clinical case report

Abstract

Introduction: Stem cells (SC) are cells capable of inducing tissue regeneration, and therefore present a therapeutic potential. In addition to the bone marrow and the umbilical cord, the dental pulp is one of the available sources of SC. Furthermore, the facts that deciduous teeth are easily accessed and are not vital organs, usually discarded after exfoliation, make SC from the pulp of human exfoliated deciduous teeth attractive to be used for safety and viability tests. **Objectives:** To describe the collection, isolation and culture of SC obtained from the pulp of deciduous teeth, as well as their characterization by flow cytometry and the induction of these cells into osteogenic and adipogenic lineages. **Methods:** The SC were easily obtained and showed a good proliferation capacity, even coming from a small amount of pulp tissue. **Results:** The flow cytometry analysis confirmed the mesenchymal SC characteristics of the cells, with low level of expression of CD34 and CD45 antigens, which are markers for hematopoietic cells, and high levels of CD105, CD166, CD90 and CD73 antigens, which are mesenchymal SC markers. The plasticity of the cells was confirmed by the identification of calcium deposits in cultures that received osteogenic medium and intracellular lipid accumulation in the cultures that received the adipogenic medium. **Conclusion:** The application of SC obtained from deciduous teeth for tissue regeneration is promising and should be further investigated. This highlights the importance of spreading among dentists the knowledge about the existence and characteristics of this source of SC, discussing the technique, its limitations and possible applications.

Keywords: Stem cells. Cell culture techniques. Deciduous teeth.

REFERÊNCIAS

1. Becker C, Jakse G. Stem cells for regeneration of urological structures. *Eur Urol.* 2007;51(5):1217-28. Epub 2007 Jan 18.
2. Christou YA, Mooret HD, Shaw PJ, Monk PN. Embryonic stem cells and prospects for their use in regenerative medicine approaches to motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2007;33(5):485-98.
3. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Anderson AJ. Human neural stem cell differentiation following transplantation into spinal cord injured mice: association with recovery of locomotor function. *Neurol Res.* 2006;28(5):474-81.
4. Krebsbach PH, Robey PG. Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. *J Dent Educ.* 2002;66(2):766-73.
5. Lechner A. Stem cells and regenerative medicine for the treatment of type 1 diabetes: the challenges lying ahead. *Pediatr Diabetes.* 2004;5 Suppl 2:88-93.
6. Prentice DA, Tarne G. Treating diseases with adult stem cells. *Science.* 2007;315(5810):328.
7. Ricardo SD, Deane JA. Adult stem cells in renal injury and repair. *Nephrology (Carlton).* 2005;10(3):276-82.
8. Rice CM, Halfpenny CA, Scolding NJ. Stem cells for the treatment of neurological disease. *Transfus Med.* 2003;13(6):351-61.
9. Santos RR, Soares MBP, Carvalho ACC. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. *Rev Bras Med Trop.* 2004;37(6):490-5.
10. Soares MBP, Lima RS, Rocha LL, Takyia CM, Pontes-de-Carvalho LC, Carvalho ACC, et al. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol.* 2004;164(2):441-7.
11. Zhan Y, Wang Y, Wei L, Chen H, Cong X, Fei R, et al. Differentiation of hematopoietic stem cells into hepatocytes in liver fibrosis in rats. *Transplant Proc.* 2006;38(9):3082-5.
12. Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Sugito T, Yoshimi R, Nagasaka T, et al. A feasibility of useful cell-based therapy by bone regeneration with deciduous tooth stem cells, dental pulp stem cells, or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for clinical study using tissue engineering technology. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(6):1891-900.
13. Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Fortes MF, Silva AG, Mota AC, et al. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2007;13(7):1067-73.
14. Soares AP, Knop LAH, Jesus AA, Araújo TM. Células-tronco em Odontologia. *Rev Dental Press Ortod Ortop Facial.* 2007;12(1):33-40.

15. Miszta-Lane H, Mirbolooki M, James Shapiro AM, Lakey JR. Stem cell sources for clinical islet transplantation in type 1 diabetes: embryonic and adult stem cells. *Med Hypotheses*. 2006;67(4):909-13. Epub 2006 Jun 9.
16. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. Shed: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(10):5807-12. Epub 2003 Apr 25.
17. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod*. 2009;35(11):1536-42. Epub 2009 Sep 20.
18. Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(3):501-6.
19. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792-806.
20. Nogueira RC. Isolamento, caracterização e análise da estabilidade citogenética após expansão in vitro de células tronco mesenquimais derivadas do epitélio amniótico, tecido adiposo e polpa de dente decíduo humano [dissertação]. Feira de Santana (BA): Universidade Federal de Feira de Santana; 2009.
21. Maler JM, Spitzer P, Lewczuk P, Kornhuber J, Herrmann M, Wiltfang J. Decreased circulating CD34^b stem cells in early Alzheimer's disease: evidence for a deficient hematopoietic brain support? *Mol Psychiatry*. 2006;11(12):1113-5.
22. Young MJ. Stem cells in the mammalian eye: a tool for retinal repair. *APMIS*. 2005;113(11-12):845-57.
23. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2003;82(12):976-81.
24. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81(8):531-5.
25. Nolla CM. The development of the permanent teeth. *J Dent Child*. 1960;27:254-66.
26. Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Iacopetti I, Sampaolesi M, Mascarello F, et al. Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. *Tissue Engineering: Part C*. Forthcoming 2009.
27. Ding G, Wang W, Liu Y, An Y, Zhang C, Shi S, Wang S. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. *J Cell Physiol*. 2010;223(2):415-22.
28. Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu TM, et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods*. 2008;14(2):149-56.
29. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*. 2009;59(2):150-7. Epub 2009 Jun 16.
30. American Academy of Pediatric Dentistry. Policy on stem cell. *Reference Manual*. 2008;31(6):84.

Enviado em: 21 de fevereiro de 2011
Revisado e aceito: 30 de junho de 2011

Endereço para correspondência

Alan Araujo de Jesus
Av. ACM, 585, bloco A, sala 806
CEP: 41.825-000 – Salvador / BA
E-mail: araujoalan@yahoo.com.br